

Разработка способа получения нового штамма дрожжей для спиртовой промышленности

О. Ю. Калужина¹, С. А. Леонова¹, Е. А. Кузнецова², Р. Р. Латыпова¹

¹ Башкирский государственный аграрный университет, г. Уфа, Республика Башкортостан

² Орловский государственный университет имени И.С. Тургенева, г. Орел, Российская Федерация

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Калужина Олеся Юрьевна

E-mail: 216322705@mail.ru

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:

данные текущего исследования доступны по запросу у корреспондирующего автора.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Калужина, О.Ю., Леонова, С.А., Кузнецова, Е.А., & Латыпова, Р.Р. (2024). Разработка способа получения нового штамма дрожжей для спиртовой промышленности. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 32(2), 51–66. <https://doi.org/10.36107/spfp.2024.2.543>

ПОСТУПИЛА: 11.09.2023

ДОРАБОТАНА: 05.06.2024

ПРИНЯТА: 15.06.2024

ОПУБЛИКОВАНА: 30.06.2024

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.



АННОТАЦИЯ

Введение: Спиртовая промышленность относится к биотехнологической отрасли, основанной на применении дрожжей-сахаромицетов, основной целью которых является превращение субстрата питательной среды в спирт. Одним из путей интенсификации таких этапов технологии, как дрожжегенерирование и брожение, является поиск новых перспективных штаммов дрожжей, адаптированных к местному сырью.

Цель: Разработать способ получения нового штамма спиртовых дрожжей для сбраживания зерна тритикале, обладающего высокой бродильной активностью и термотолерантными свойствами.

Материалы и методы: Объектом исследования являются производственные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, отобранные со стационарной фазы роста из аппаратов чистых культур на спиртовом заводе ЗАО «Башспирт». Для проведения исследования применялась ультразвуковая установка Nordberg NU 20 с частотой ультразвуковых волн 22 кГц. Для приготовления суслы применялась тритикале озимая сорта Башкирская короткостебельная. Изучен ее физико-химический состав и приготовлено сусло по механико-ферментативной схеме на миниспиртовой установке в учебно-производственной лаборатории ФГБОУ ВО Башкирского ГАУ. Для выведения и размножения чистой культуры применялся комбинированный метод Пастера и Коха, который предусматривает многоступенчатое разведение культуры и посев на твердые питательные среды. Полученные штаммы дрожжей прошли идентификацию и патентное депонирование в ВКПМ Биоресурсного Центра НИЦ «Курчатовский институт».

Результаты: На основании проведенных исследований разработан способ получения нового штамма спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* УЗ-55 с применением ультразвука и экстракта дрожжей.

Выводы: Выведенный штамм позволяет повысить выход спирта на 2,05 % и снизить количество примесей в зрелой бражке в 1,19 раз по сравнению с контролем при повышенных температурах брожения 33–37 °С.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

спирт этиловый ректификованный; спиртовые дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*; ультразвук; дрожжевой экстракт

Development of a Method for Obtaining a New Yeast Strain for the Alcohol Industry

¹ Bashkir State Agrarian University,
Ufa, Republic of Bashkortostan

² I.S. Turgenev Orel State University,
Orel, Russian Federation

Olesya Y. Kaluzhina¹, Svetlana A. Leonova¹, Elena A. Kuznetsova²,
Ruzalina R. Latypova¹

CORRESPONDENCE:

Kaluzhina Olesya Yurievna

E-mail: 216322705@mail.ru

DATA AVAILABILITY:

Data from the current study are available upon request from the corresponding author.

FOR CITATIONS:

Kaluzhina, O.Yu., Leonova, S.A., Kuznetsova, E.A., & Latypova, R.R. (2024). Development of a method for obtaining a new yeast strain for the alcohol industry. *Storage and Processing of Farm Products*, 32(2), 51–66.
<https://doi.org/10.36107/spfp.2024.2.543>

RECEIVED: 11.09.2023

REVISED: 05.06.2024

ACCEPTED: 15.06.2024

PUBLISHED: 30.06.2024

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.

ABSTRACT

Introduction: The alcohol industry is a biotechnological sector based on the use of *Saccharomyces* yeast, whose main goal is to convert the substrate of the nutrient medium into alcohol. One way to intensify such technological stages as yeast generation and fermentation is to search for new promising yeast strains adapted to local raw materials.

Purpose: To develop a method for obtaining a new strain of alcohol yeast for fermenting triticale grain, possessing high fermentation activity and thermotolerant properties.

Materials and Methods: The study focuses on the *Saccharomyces cerevisiae* production yeast selected from the stationary growth phase from pure culture apparatus at the Bashspirt distillery. The study was conducted using the Nordberg NU 20 ultrasonic installation with an ultrasonic wave frequency of 22 kHz. Triticale winter wheat variety Bashkirsкая Korotkostebel'naya was used to prepare the wort. Its physicochemical composition was studied and the wort was prepared using a mechanical-enzymatic scheme at a mini-distillery installation in the training and production laboratory of Bashkir State Agrarian University. A combined Pasteur and Koch method, involving multistage culture dilution and inoculation on solid nutrient media, was used for the isolation and propagation of pure cultures. The obtained yeast strains were identified and patent-deposited in the Russian National Collection of Industrial Microorganisms of Bioresource Center at the Kurchatov Institute National Research Center.

Results: Based on the conducted research, a method for obtaining a new strain of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol yeast UZ-55 using ultrasound and yeast extract was developed.

Conclusion: The developed strain allows for a 2.05 % increase in alcohol yield and a 1.19 times reduction in the amount of impurities in the mature mash compared to the control at elevated fermentation temperatures of 33–37 °C.

KEYWORDS

rectified ethyl alcohol; alcohol yeast *Saccharomyces cerevisiae*; ultrasound; yeast extract



ВВЕДЕНИЕ

Качество спирта этилового ректифицированного из пищевого сырья должно отвечать требованиям стандарта (ГОСТ 5962–2013)¹, согласно которым для выпуска спирта сортов «Люкс» и «Альфа» должно применяться не только качественное зерновое сырье (Крикунова, 2011)², но и расы дрожжей, обладающие необходимыми морфологическими и физиологическими признаками (Цед, 2021). Выбор подходящих штаммов дрожжей важен не только для максимизации выхода спирта, но и для поддержания сенсорных качеств напитка (Walker & Stewart, 2016). Существует большое разнообразие промышленных штаммов *S. cerevisiae*, и для разработки новых улучшенных штаммов важно выбрать исходный штамм с наиболее подходящим физиологическим фоном клетки (Walker & Walker, 2018).

Наиболее известные расы спиртовых дрожжей представлены в Таблице 1.

Применение чистых культур дрожжей в производстве позволяет повысить качество спирта и его выход. Спиртовые дрожжи должны обладать высокой бродильной активностью, устойчивостью к повышенным температурам и концентрациям сухих веществ сбраживаемого сусла (Оверченко, 2017). Получение новых штаммов дрожжей проводится методами многоступенчатой селекции, к которым можно отнести отбор наиболее продуктивных промышленных рас, с последующим исследованием их изменчивости в экстремальных условиях на жидких питательных средах и выделением монокультур путем посева на твердые питательные среды. Также селекцию можно проводить с применением химического или физического воздействия на дрожжи, для выведения и отбора отдельных активных вариантов и популяций, с последующим тестированием по признакам термотолерантности и осмофильности (Кузнецова, 2016; Давыденко, 2012).

Существует ряд работ, исследовавших влияние различных физических факторов на выход спир-

Таблица 1

Характеристика спиртовых дрожжей

Род, вид, раса	Форма и размер клеток	Способны ассимилировать	Не способны ассимилировать	t, °C/pH
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> XII	округлая или овальная 5–6,2 · 5–8 мкм	глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, рафинозу на 1/3, глицерин, молочную и уксусную кислоту, мочевины и аминокислоты	лактозу, инулин, ксилозу, рабинозу, декстрины, крахмал, маннит, сорбит, дульцит, янтарную, яблочную, винную и лимонную кислоты	29–35/ 3,8–4,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> M	округлая, яйцевидная, эллипсоидная 5,6–10,6 · 6,2–11,2 мкм			29–32, 3,8–4,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Г-660	мелкая, удлинённая 1,8 · 1,3 мкм			30/3,8–4,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> K-81	округлая или овальная форму, 6,5 · 7,3 мкм			32–34/ 3,8–4,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-717	вытянутая, реже округлая, 3,0 · 6,5 мкм	декстрины, глюкозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, рафинозу на 1/3, глицерин, молочную и уксусную кислоту, мочевины и аминокислоты		18–36/ 3,8–4,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 985-T	крупная, яйцевидная, овальная или удлинённая	глюкозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, рафинозу на 1/3	лактозу, инулин, ксилозу, рабинозу, крахмал	30–38/ 3,8–4,2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 987-O	7,0–10,0 · 5,0–7,5 мкм			30/3,8–4,2

Примечание. Адаптировано из Римарева (2010).

¹ ГОСТ 5962–2013 (2023) Спирт этиловый ректифицированный из пищевого сырья. Технические условия. М.: Стандартинформ.

² Патент № 2473693 С1 Российская Федерация, МПК C12P 7/06. Способ производства этилового спирта из крахмалсодержащего сырья: № 2011148976/10: заявл. 02.12.2011: опубл. 27.01.2013 / Л. Н. Крикунова, М. Э. Сидякин, В. Я. Черных [и др.].

та. Физическая активация включает термическую, световую, радиационную, электрическую, электромагнитную или акустическую обработку биологических объектов. Использование этих методов в настоящее время расширяется, поскольку они доступны и экологически безопасны: оказывают гораздо меньшую нагрузку на продукт и окружающую среду (Permyakova et al., 2023). Так, Ferreira et al. (2019) показали, что последовательные циклы ферментации в условиях сублетального давления (15 и 25 МПа) могут стимулировать адаптацию к давлению и увеличить скорость, выход и продуктивность спиртового брожения. Исследователи из университета Сарагосы осуществляли обработку биомассы дрожжей импульсным электрическим полем и показали, что для инактивации дрожжей требуются электрические поля напряженностью свыше 10 кВ/см (Berzosa et al., 2023). Наиболее эффективной считается обработка ультразвуком (Soro et al., 2021; Talal, 2011).

В процессе выведения чистых культур дрожжей также нужно обратить внимание на подбор полноценной питательной среды для поддержания жизнедеятельности дрожжей и их размножения. Для производства спирта сортов «Экстра», «Люкс» и «Альфа» необходимо не только качественное зерновое сырье и вода, но и правильный подбор рас дрожжей, способных более полно сбраживать углеводы и выдерживать повышенные температуры. Одним из способов селекции новых штаммов является отбор из производственных сред наиболее сильных по морфологическим и физиологическим признакам дрожжей и воздействие физических мутагенов, с последующим выделением активных вариантов и их тестированием по признаку термофильности (Римарева, 2010).

Несмотря на то, что ультразвук применяется в пищевой промышленности уже более 50 лет и доказано, что ультразвуковые колебания способны улучшать качество пищевых продуктов и технологические процессы их производства (Бурнышева, 2022; Разинькова, 2021; Стремин, 2023), механизм воздействия параметров ультразвука на возникновение и характер мутаций спиртовых дрожжей практически не изучен. Разработать способ получения нового штамма спиртовых дрожжей

Целью данного исследования является изучение мутирующего воздействия ультразвука, повы-

шающего термотолерантные свойства и тем самым обеспечивающего получение нового штамма спиртовых дрожжей для сбраживания зерна тритикале, обладающего высокой бродильной активностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объект исследования — производственные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, отобранные со стационарной фазы роста из аппаратов чистых культур на спиртовом заводе ЗАО «Башспирт».

Оборудование

Для проведения исследования применялась ультразвуковая установка Nordberg NU 20, снабженная одним преобразователем. Мощность нагрева — 200 Вт. Мощность ультразвука — 80 Вт. Максимальная температура нагрева — 80 °С. Частота ультразвуковых волн — 22 кГц (Фото 1). Год выпуска — 2020.

Методы

Подсчет количества мертвых клеток в дрожжевой суспензии производили при помощи микроскопа и раствора метиленовой сини, окрашивающей мертвые клетки в синий цвет.

Определение содержания гликогена в клетках дрожжевой суспензии производили под микроскопом при 100-кратном увеличении, после окрашивания образца 0,5 %-ным раствором йода.

Определение процентного содержания почкующихся клеток производили под микроскопом при 100-кратном увеличении, проводя подсчет общего количества клеток, в том числе почкующихся, в пяти полях зрения.

Определение общего количества клеток проводили при помощи камеры Горяева.

Определение pH суслы проводили на универсальном иономере марки ЭВ-7.

Качество тритикале и тритикалевого сусла определяли согласно требованиям ГОСТ 34023–2016³ и ГОСТ Р 52673–2006⁴ соответственно.

Содержание летучих примесей в дистилляте зрелой бражки проводили на газовом хроматографе согласно ГОСТ 30536–97⁵.

Процедура исследования

Для приготовления сусла применялась тритикале озимая Башкирская короткостебельная физико-химические показатели которой представлены в Таблице 2. Тритикале достаточно давно применяется для производства спирта как менее дорогая альтернатива пшенице (Wang, 1997).

Таблица 2

Физико-химические и микробиологические показатели тритикале

Показатели	Количество
Влажность зерна, %	13,9
Крахмал, %	54,0
Содержание сахара, %	3,1
Условная крахмалистость (на абсолютно сухой вес), %	62
Массовая доля растворимых углеводов, %	4,6
Массовая доля сухого жира, %	1,6
Массовая доля сухой золы, %	1,62
КМАФАнМ, КОЕ, г	5,0•10 ⁴
Количество условного крахмала, взятое на приготовление сусла, кг	1,326

Качество исследуемого зерна тритикале соответствует требованиям ГОСТ 34023–2016⁶. Влажность 13,9% соответствует сухому зерну, в котором все жизненные процессы сведены к минимуму. Количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов, которые характеризуют свежесть и безопасность зерна, находятся в пределах нормы.

Сусло готовили по механико-ферментативной схеме, с применением дополнительного разва-

ривания сырья при температуре до 120°C для подавления посторонней микрофлоры. Подготовку сусла и проведение этапа брожения осуществляли на миниспиртовой установке в учебно-производственной лаборатории ФГБОУ ВО Башкирского ГАУ (Фото 1). Данная установка позволяет получать зерновое сусло с последующим его сбраживанием, получением спирта-сырца, а также ректификованного спирта 96,3% об.

Фотография 1

Универсальный миниспиртзавод



Замесы для проведения эксперимента готовили из тонкого помола зерна тритикале с 90–95 % проходом через сито диаметром 1 мм. Помол зерна смешивали с подогретой до 40–45 °C водопроводной водой в соотношении 1:3,5 и выдерживали 10–15 минут. Полученный замес подваривали при тщательном перемешивании и затем подогревали до 68–73 °C, после чего вносили ферментные препараты разжижающего действия. Выдерживали при данной температуре в течение 2–2,5 часов, доводили температуру до 95–100 °C и выдерживали 30–40 минут. Затем охлаждали до температуры

³ ГОСТ 34023–2016 (2023) Тритикале. Технические условия. М.: Стандартинформ.

⁴ ГОСТ Р 52673–2006 (2023) Спирт этиловый из пищевого сырья. Термины и определения. М.: Стандартинформ.

⁵ ГОСТ 30536–97 (2023) Водка и спирт этиловый. Газохроматографический метод определения содержания токсичных микропримесей. М.: Стандартинформ.

⁶ ГОСТ 34023–2016 (2023) Тритикале. Технические условия. М.: Стандартинформ.

58–60 °С, добавляли ферментный препарат осахаривающего действия и проводили осахаривание в течение 30 минут. Окончание процесса осахаривания контролировали по йодной пробе. Технологические показатели осахаренного сусла, приготовленного по механико-ферментативной схеме водно-тепловой обработки сырья, представлены в таблице 3.

Таблица 3
Технологические показатели тритикалевого сусла

Показатели	Количество
Показатели	Количество
Содержание сухих веществ, %	18,0
Количество растворенных углеводов, г/дм ³	15,3
pH	6,6
Кислотность, град	0,23
Видимая доброкачественность, %	74,1
Содержание редуцирующих веществ, г/100 см ³	8,8
Содержание общих редуцирующих веществ, г/100 см ³	13,1

Для выведения и размножения чистой культуры дрожжей использовали агаризованную питательную среду, которую разливали в чашки Петри для первого этапа выращивания и в пробирки для приготовления скошенных сред для хранения.

Агаризованную питательную среду для размножения колоний готовили, используя производственное сусло, следующим образом: сусло после варки и охлаждения до 20 °С фильтровали через ватно-марлевый слой, помещали в автоклав на 20 минут для стерилизации при температуре 121 °С, вносили агар-агар бактериологический питательный в количестве 2 % к объему сусла, хорошо перемешивали и повторно автоклавировали 5 минут при температуре 100 °С. Готовую агаризованную питательную среду разливали по чашкам Петри и в пробирки для последующего скашивания.

Для получения изолированных колоний использовали метод разведения. Проводили отбор проб дрожжевой суспензии через каждые 5 минут обработки ультразвуком и готовили ряд последовательных разведений в стерильной среде (дистиллированной воде). С каждым разведением количество клеток уменьшается, и можно получить такие разведения, в которых будет находиться только одна клетка, которая даёт начало чистой культуре. В нашем случае проводили шести-

кратное разведение каждого образца и последующий посев микробиологической петлей на застывшие питательные среды в стерильные чашки Петри. Все опытные образцы и контрольный вариант помещали в термостат для культивирования при температуре 35 °С вверх дном. Через 72 часа из каждой жизнеспособной клетки образовывались видимые невооружённым глазом скопления дрожжей — колонии.

Анализ данных

Статистическую обработку данных проводили, используя методы математической статистики с применением программного обеспечения Microsoft Excel. Для обработки результатов исследований вычисляли средние арифметические значения величин из трех измерений для каждого опытного образца, стандартное отклонение не превышало 3,0% при доверительной вероятности P = 0,95.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Активирующее воздействие ультразвука на синтез биомассы

В предыдущих исследованиях было установлено, что воздействие ультразвука (далее УЗ) с частотой колебаний 22 кГц и интенсивностью колебаний 1 Вт/см² на дрожжевую суспензию в течение 3,5–4,5 минут способствует повышению синтеза биомассы на 35 % в процессе дрожжегенерирования и увеличению бродильной активности на 28 % в процессе брожения. Это в определенной степени согласуется с данными других исследователей. Так, Soro et al. (2021) рекомендуют частоты 45 и 130 кГц, которые не оказывали разрушающего эффекта на лаг-фазу и скорость роста популяций дрожжей. В обработанном ультразвуком дрожжах увеличивается содержание твердых веществ (Eomet, 2022).

Дезинтегрирующее воздействие ультразвука на синтез биомассы

Изучение дезинтегрирующий эффект ультразвука на дрожжевую суспензию свидетельствует, что продолжительное (более 35 минут) воздействие ультразвука губительно действует на дрожжи и вызывает разру-

шение клеточных стенок (автолиз). Используя данный фактор, был получен дрожжевой экстракт, который применялся в качестве дополнительного источника питания для дрожжей. На заключительном этапе вышеописанных исследований (Бодрова, 2006) была поставлена задача изучить влияние ультразвука на морфологические и физиологические признаки дрожжей и провести тестирование отобранных популяций по признаку толерантности и адаптации к конкретному зерновому сырью для отбора наиболее перспективной расы спиртовых дрожжей, в случае установления положительного эффекта от ультразвука.

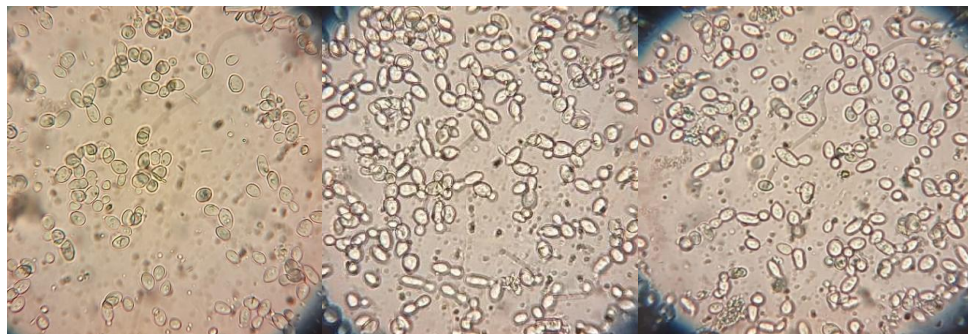
Способ выведения нового штамма спиртовых дрожжей.

Выведение нового штамма осуществляли следующим образом. В ультразвуковую ванну вносили дрожжевую суспензию производственных дрожжей и начинали обработку, проводя отбор проб каждые 5 минут, для установления количества мертвых клеток, и отбора наиболее подходящих по размерам и форме дрожжей для дальнейшего пересева на твердую питательную среду в чашки Петри. Морфологически дрожжи *Saccharomyces* могут иметь круглую или эллипсоидную форму в зависимости от фазы роста и условий культивирования (Maicas, 2020)

Микрофотографии колоний дрожжей представлены на Фотографиях 2–13.

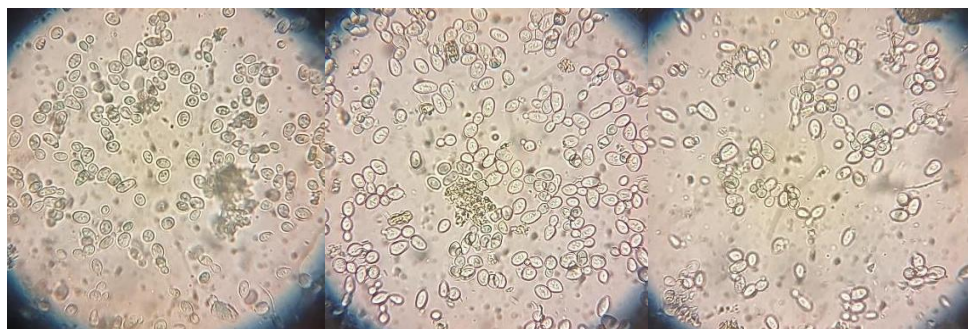
Фотографии 2–4

Контроль (без УЗ) и дрожжи, обработанные УЗ в течение 5 и 10 минут



Фотографии 5–7

Дрожжи, обработанные УЗ в течение 15, 20 и 25 минут



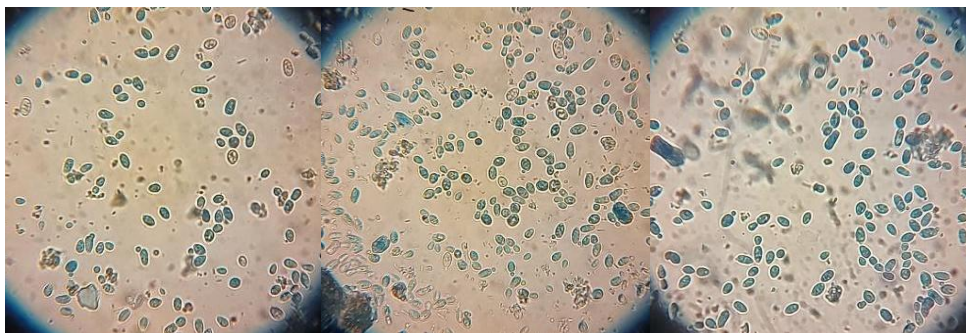
Фотографии 8–10

Дрожжи, обработанные УЗ в течение 30, 35 и 40 минут



Фотографии 11–13

Дрожжи, обработанные УЗ в течение 45, 50 и 55 минут



Согласно фото 13, на 50 минуте ультразвукового воздействия на дрожжевую суспензию процент мертвых клеток достигает 100%, т.е. наступает полная гибель дрожжей. Известно, что при разрушении клеточных стенок (автолизе) происходит выход содержимого дрожжей во внешнюю среду. На данном свойстве основаны способы получения различных биологически активных добавок и подкормок для дрожжей (Патент № 2065275⁷, 1996; Авторское свидетельство № 1606528, 1990⁸), поэтому полученный дрожжевой экстракт (ДЭ) с данного этапа ультразвуковой обработки использовали в качестве дополнительного источника питания дрожжей на этапе дрожжегенерирования.

Первые мертвые клетки были обнаружены на 5 минуте обработки дрожжевого суспензии ультразвуком (Фото 5). Поминутный график изменения количества мертвых клеток, а также динамика изменения температуры и pH среды в процессе УЗ обработки представлены на Рисунках 1–3.

Рисунок 1

Изменение температуры среды в результате УЗ воздействия

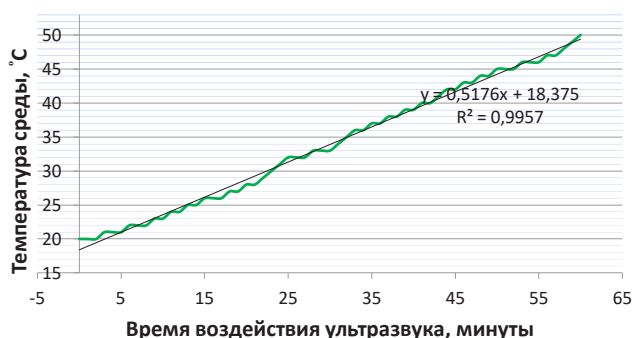


Рисунок 2

Изменение pH среды в результате УЗ воздействия

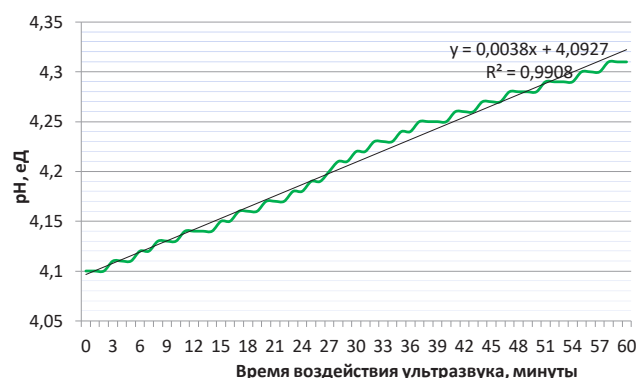
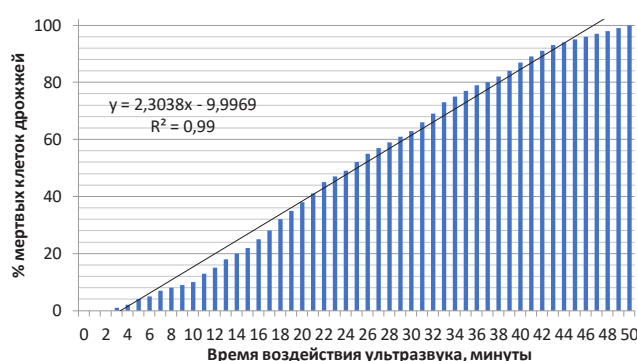


Рисунок 3

Количество мертвых клеток в результате УЗ воздействия



Одним из факторов воздействия ультразвука на жидкие среды является тепловой эффект. Из рисунка 1 видно, что в процессе 50-минутного воздействия ультразвука идет равномерный подъем температуры, который в конце обработки достигает 50 °С. Нагревание происходит за счет волнового движения распространения энергии, акустической кавитации,

⁷ Патент № 2065275 С1 Российская Федерация, МПК А23J 1/18, С12N 1/06.

⁸ Авторское свидетельство № 1606528 А1 СССР, МПК С12N 1/06, А23J 1/18, С12R 1/86. Способ получения автолизата дрожжей-сахаромицетов: № 4487045: заявл. 27.09.1988: опубл. 15.11.1990 / Е. Н. Датунашвили, В. М. Степанов, Г. Н. Руденская

в результате которой в водной суспензии формируются пузырьки, которые взрываются (Ashokkumar, 2008; John, 2019). Также ультразвук влияет на pH среды, смещая ее в щелочную сторону, что объясняется распадом молекул воды на ионы H^+ и OH^- и их последующим взаимодействием с молекулами воды с образованием H_2O . Вследствие этого увеличивается количество ионов OH^- , обеспечивающих щелочную реакцию. В исследуемых образцах pH суслу смещается в щелочную сторону на 0,16 ед (Рисунок 2).

Вследствие взрыва пузырьков в результате кавитации происходит гибель клеток вокруг них по причине разрыва дрожжевых стенок. Поэтому, начиная с 5 минуты, в среде обнаруживаются мертвые клетки (Рисунок 3). Выживаемость снижается на значительную величину и после 7 минуты содержание мертвых клеток превышает 10%. На 55 минуте процент мертвых клеток достигает 95%.

Образцы, отобранные из обрабатываемой среды через каждые 5 минут, использовали для получения чистых культур методом разведения и посева, подробно описанного в методах исследования. После посева чашки Петри помещали в термостат крышками вниз и выдерживали при температуре 30 °C в течение 3-х суток. В результате визуального контроля для дальнейших исследований были отобра-

ны образцы с наиболее крупными изолированными клетками, а именно образцы после 20, 25, 30 и 35 минутной обработки (Опыт 1–4). Результаты выращивания представлены на Фотографиях 14–18.

Из выбранных образцов пересевали наиболее крупные 3–4 колонии, с целью сохранения культуры, и делали пересев с помощью бактериологической петли на поверхность скошенного суслу-агара в пробирки методом истончающегося штриха и помещали в термостат при температуре 30 °C на 72 часа.

Применение чистых культур дрожжей на этапе дрожжегенерирования

Чистые культуры выведенных дрожжей после 20, 25, 30 и 35 минутной ультразвуковой обработки и контрольный вариант применяли на этапе дрожжегенерирования и брожения при получении спирта. Для этого в каждую пробирку вносили стерильное профильтрованное сусло и выдерживали 6 часов для регенерации дрожжей. Далее переносили в колбы на 250 мл со 100 мл стерильного нефильтрованного тритикалевого суслу, вносили дрожжевой экстракт, полученный на 55 минуте ультразвукового воздействия в количестве 10% от объема, и продолжали выращивание в термостате при температуре 34–35 °C.

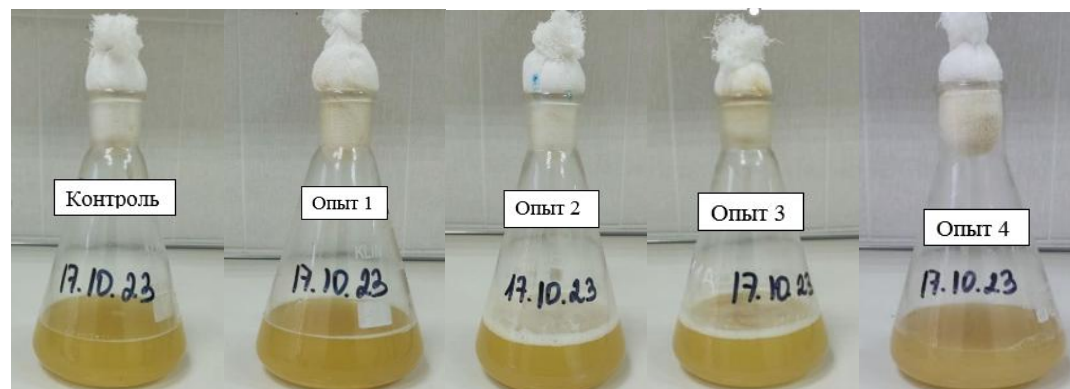
Фотографии 14–18

Культуры дрожжей на 3 сутки выращивания



Фотографии 19–23

Внешний вид процесса дрожжегенерирования на 6 час

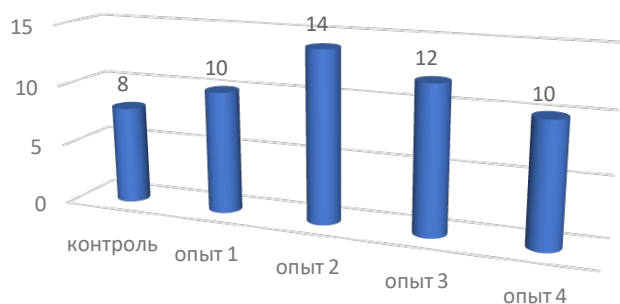


На фото 21 видно, что в опыте 2 более активно происходит рост дрожжей. Слой бродящей пены на поверхности составляет 9 мм, тогда как в контроле и в опыте 4 слой пены не превышает 2 мм. Пена малоактивна.

В процессе дрожжегенерирования контролировали бродильную активность по убыли CO_2 , а также общее количество почкующихся клеток и клеток с гликогеном. Результаты представлены на Рисунках 4–7.

Рисунок 4

Бродильная активность по убыли CO_2 , г



■ Суммарная убыль углекислого газа на 24 час брожения, г

Рисунок 5

Влияние выведенных чистых культур дрожжей на накопление общего количества клеток

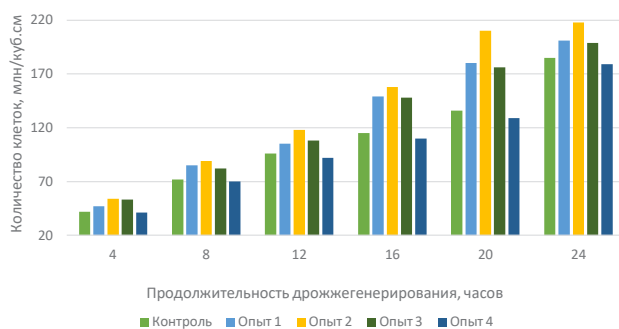


Рисунок 6

Влияние на количество почкующихся клеток, %

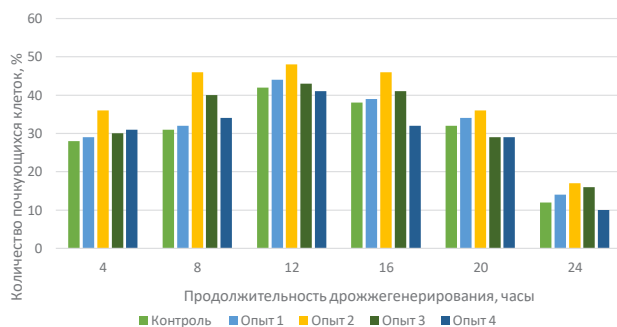
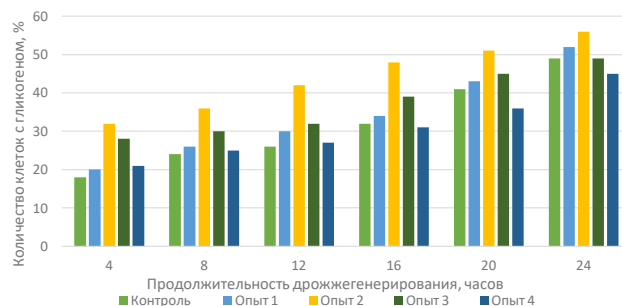


Рисунок 7

лияние выведенных чистых культур дрожжей на количество клеток с гликогеном, %



В результате оценки морфологических свойств дрожжей установлено, что необходимое количество клеток засевных дрожжей (рисунок 5), составляющее более 150 млн/см³, достигается в опыте 2 на 20 час дрожжегенерирования, что на 4 часа сокращает данный этап, по сравнению с контролем. Из рисунков 6 и 7 видно, что в процессе дрожжегенерирования максимальное количество почкующихся клеток и клеток с гликогеном накапливается в опыте 2. Также было отмечено, что дрожжевые клетки под микроскопом более крупные, упитанные, имеют хороший тургор, что свидетельствует об их более активном физиологическом состоянии. Повышенная температура дрожжегенерирования, составившая во всех опытных вариантах 35 °С, не действует угнетающе на дрожжи, по сравнению с контролем.

Применение чистых культур дрожжей на этапе брожения в лаборатории

Дрожжи, полученные на этапе дрожжегенерирования, применяли в качестве засевных для проведения этапа брожения в лабораторных условиях. Для этого проводили пересев всех образцов в колбы с объемом сула 1000 мл и оставляли на брожение в термостате при температуре 34–35 °С на 48 часов.

В каждом лабораторном образце полученной зрелой бражки, представляющей собой конечный продукт процесса брожения, определяли физико-химический состав при помощи анализатора жидких компонентов «Колос-2». Данные приведены в Таблице 4.

Помимо показателей, представленных в Таблице 4, дополнительно проанализировали массовую долю

Таблица 4
Характеристика спиртовых дрожжей

Показатели	Контроль	Опыт 1 УЗ 20	Опыт 2 УЗ 25	Опыт 3 УЗ 30	Опыт 4 УЗ 35
Температура, С	20,03	20,29	20,01	20,51	20,77
Спирт, %	6,89	8,16	9,94	8,62	7,46
Экстракт, %	4,13	4,09	3,65	3,83	4,15
Плотность	1,0019	1,0021	0,9998	1,0003	1,0018
Спирт, об. %	8,69	9,09	9,95	9,66	9,47
ЭНС	18,0	17,5	17,8	18,01	18,1
Дейст. ст. сбраж.	77,3	76,7	79,5	78,9	77,1
Вид. ст. сбраж.	94,5	94,0	97,2	96,5	94,5
Видимый экст	1,00	1,05	0,49	0,63	1,00

Таблица 5
Показатели зрелой бражки

Показатели	Контроль	Опыт 1 УЗ 20	Опыт 2 УЗ 25	Опыт 3 УЗ 30	Опыт 4 УЗ 35
Массовая доля углеводов %: Общих Растворимых	0,46 0,33	0,27 0,18	0,32 0,20	0,39 0,27	0,44 0,35
Массовая доля нерастворенного крахмала, %	0,12	0,08	0,10	0,12	0,14
Активная кислотность, рН	4,70	4,68	4,68	4,69	4,71
Титруемая кислотность, град	0,36	0,41	0,42	0,42	0,39

общих, растворимых углеводов и нерастворенного крахмала, а также активную и титруемую кислотности.

Из полученных данных следует, что образец, полученный из чистой культуры дрожжей после 25 минутного ультразвукового воздействия на дрожжевую суспензию, обеспечил более высокий выход спирта, по сравнению с контролем (+2,05 %) и более глубокое сбраживание сахара. Похожие данные получены зарубежными учеными, в том числе на других продуктах. Так, обработка дрожжей ультразвуком повысила содержание сухих веществ в ферментированном напитке из ананасов (Aguilar, 2022).

Применение чистых культур дрожжей на производственном этапе

Данный образец использовали для проведения процесса брожения на лабораторно-производственной установке объемом 40 литров (Фото 2).

В качестве сравнения применяли контрольный вариант, сброженный дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*, не подвергнутыми обработке ультразвуком. Начальная температура среды брожения 24 °С.

В процессе сбраживания контролировали бродильную активность, общее количество клеток, содержание несброженных и сухих веществ. Результаты представлены на Рисунках 8–11.

Рисунок 8
Бродильная активность по убыли CO₂

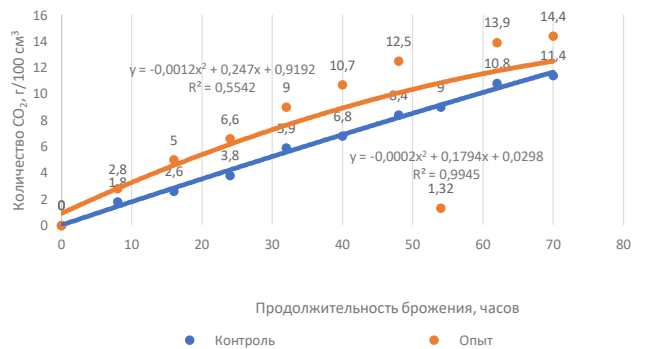


Рисунок 9
Содержание общего количества клеток при сбраживании
сусла

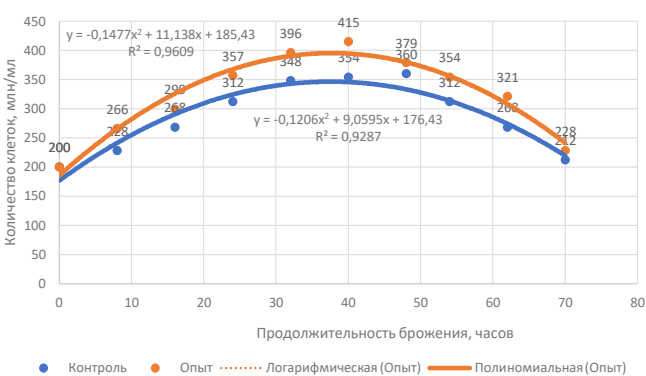


Рисунок 10
Содержание несброженных углеводов при сбраживании
сусла

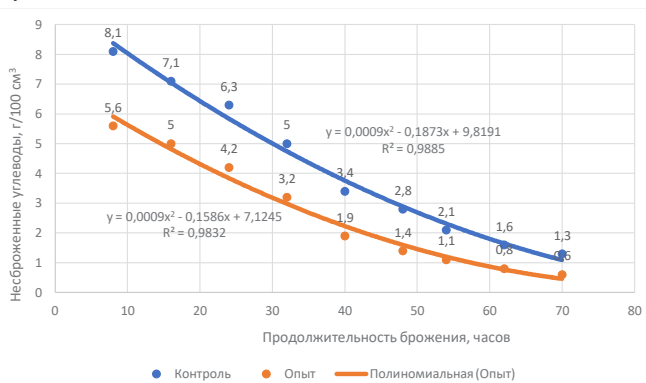
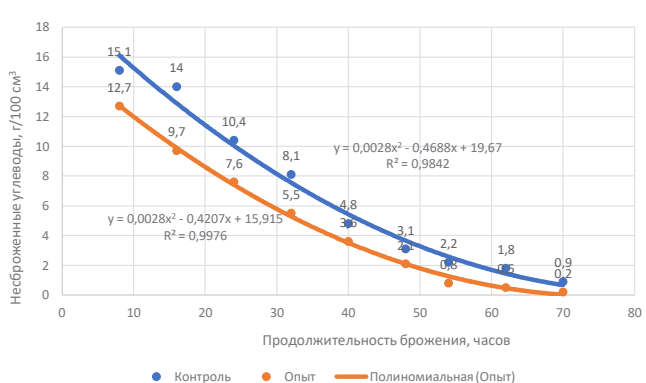


Рисунок 11
Содержание сухих веществ при сбраживании сусла



Определение летучих примесей в дистилляте зрелой бражки проводили на газовом хроматографе согласно ГОСТ 30536–97. Полученные результаты приведены в Таблице 6.

Таблица 6
Летучие примеси в дистилляте зрелой бражки

Наименований показателей	Содержание, мг/дм³	
	Контроль	Опыт УЗ 55
Ацетальдегит	31,9	21,25
Метилацетат	12,2	11,9
Этилацетат	218,2	175,5
Метанол, %	0,0070	0,005
2-пропанол	2,2	2,4
1-пропанол	195,8	233
Изобутанол	1571,7	920,5
1-Бутанол	18,9	62,2
Изоамилол	7290,5	6431,75
Суммарное содержание примесей	9341,407	7858,505

Как следует из Таблицы 6, содержание примесей спирта в бражном дистилляте опытного образца снизилось в 1,19 раз по сравнению с контрольным образцом.

Штамм идентифицирован (Фотография 13) и депонирован (Фотография 14) во ВКПМ Биоресурсного Центра НИЦ «Курчатовский институт» 6 октября 2022 года. Регистрационный номер ВКПМ: У-5080. Получен патент № 2811442 (Фотография 15).

Идентификация штамма проведена на основе анализа последовательности рибосомальных генов.

Фотографии 13–15
Итоги идентификации, патентного депонирования и патент



Для установления филогенетического родства близких видов был использован метод сравнения нуклеотидных последовательностей, кодирующих ген 5,8 рРНК и внутренние транскрибируемые спейсеры ITS1 и ITS2. Секвенирование проводилось на автоматическом секвенаторе AE3000. Для анализа секвенсов использовалась специали-

зированной компьютерная программа BLAST. По результатам проведенного анализа установлено, что исследуемый штамм наиболее близок к виду *Saccharomyces cerevisiae*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известные к настоящему времени результаты исследований механизмов воздействия ультразвука на спиртовые дрожжи в основном характеризуют его активирующее и дезинтегрирующее влияние на морфологию и физиологию дрожжей. Ряд авторов установили только активирующий эффект воздействия ультразвука, который усиливает проникновение питательных веществ и биологически активных веществ в клетку, что в дальнейшем интенсифицирует процессы подготовки конечных продуктов (Стецов, 2023; Гречишникова, 2015; González-Centeno, 2014). Дезинтегрирующий эффект ультразвука применялся только для получения различных автолизатов дрожжей (Bertolo, Biz, Kempka, 2019).

Практически не исследовано влияние примененных нами параметров ультразвука с частотой колебаний 22 кГц и интенсивностью колебаний 1 Вт/см² на набор таких физиологических свойств дрожжей, как термотолерантность и осмофильность, в отличие от ультрафиолета, электричества, электромагнитного поля (Рынк, 2023; Qian, 2021; Osintsev, 2021). Механизмы мутации на генном уровне к настоящему времени не изучены.

С применением указанных выше параметров ультразвука выведен новый штамм дрожжей из производственной дрожжевой суспензии, который проявил высокую активность при дрожжегенерировании и брожении, а также позволил повысить выход и качество спирта ректификованного из крахмалсодержащего сырья при температуре брожения 35 °С. Применение термотолерантных штаммов дрожжей является перспективным направлением в совершенствовании технологии получения спирта, что доказано рядом авторов за последние 20 лет (Римарева, 2019; Оверченко, 2017; Prado, 2020; de Souza, 2018; Xu, 2018; Choudhary, 2016).

Продолжительность брожения при применении данного штамма сокращается на 18–22 %, по срав-

нению с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* XII. Количество мертвых клеток не превышает 5 %. Сбраживание сахаров происходит до концентрации спирта 10–13 %. Концентрация клеток составляет 120–130 млн./мл. Количество почкующихся клеток — 8–9 %. Количество мертвых клеток — 1 %. Активная кислотность питательной среды — pH 4,2–5,5.

Применение данного штамма спиртовых дрожжей позволит интенсифицировать самые продолжительные стадии в технологии спирта, а именно процессы дрожжегенерирования и брожения, и пополнит банк дрожжей для данной отрасли (Кулназаров, 2015).

Установлен мутирующий эффект ультразвука, выражающийся в изменении нуклеотидной последовательности генома.

Основным ограничением текущего исследования по получению нового штамма спиртовых дрожжей является применение ультразвуковой установки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования позволили установить мутагенное влияние ультразвука на физиологические свойства спиртовых дрожжей, состав зрелой бражки и ряд других производственных показателей. В результате получен, идентифицирован и запатентован новый штамм спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* УЗ-55. Идентификация штамма проведена на основе анализа последовательности рибосомальных генов. Полученный штамм планируется применять в технологии получения спирта из зерна тритикале, что позволит проводить брожение при повышенных температурах — 33–37 °С, а также увеличить выход спирта и снизить суммарное содержание примесей в зрелой бражке.

Результаты исследования убедительно демонстрируют, что ультразвуковое воздействие является мощным фактором, способным направленно изменять не только физиологические свойства, но и геном дрожжей и тем самым получать новые штаммы, способные обеспечить более высокие производственные результаты. Значимым явля-

ется тот факт, что разработанный способ может быть осуществлен на любом спиртовом заводе, перерабатывающем крахмалсодержащее сырье, при условии наличия лабораторной ультразвуковой установки с объемом рабочей ванны 1...5 дм³, что подтверждено актом внедрения на Белгородском спиртовом заводе, где в качестве сырья применяется кукуруза.

Полученный штамм относится к категории спиртовых дрожжей. Для использования способа обработки дрожжей ультразвуком в других отраслях пищевой промышленности — винодельческой, хлебопекарной, пивоваренной, требуются дальнейшие исследования, направленные на получение новых штаммов винных, хлебопекарных, пивоваренных дрожжей.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Калужина Олеся Юрьевна: постановка и анализ проблемы; планирование, проведение и обработка результатов эксперимента; визуализация данных; подготовка и редактирование рукописи статьи; лабораторно-производственные испытания.

Леонова Светлана Александровна: обзор литературы; подготовка и редактирование рукописи статьи; формулирование выводов исследования.

Кузнецова Елена Анатольевна: постановка проблемы; разработка концепции статьи; формулирование выводов исследования.

Латыпова Рузалина Рафисовна: проведение лабораторных исследований; первичная обработка полученных данных.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Бодрова, О. Ю. (2006). *Интенсификация процессов дрожжегенерирования и брожения в технологии спирта с использованием ультразвуковой обработки засевных дрожжей* [Кандидатская диссертация]. Московский государственный университет пищевых производств.
- Bodrova, O. Yu. (2006). *Intensification of yeast generation and fermentation processes in alcohol technology using ultrasonic treatment of seed yeast* [PhD dissertation]. Moscow State University of Food Production. (In Russ.)
- Бурнышева, Т. О. (2022). Обзор российских исследований применения ультразвука в пищевой индустрии. *Реалии и современные возможности науки: сборник научных трудов по материалам III Международной научно-практической конференции* (с. 30–33). Москва: Научно-издательский центр Толмачево.
- Burnysheva, T. O. (2022). Review of Russian studies on the application of ultrasound in the food industry. *Realities and Modern Opportunities of Science: Collection of Scientific Papers Based on the Materials of the III International Scientific and Practical Conference* (pp. 30–33). Moscow: Scientific Publishing Center Tolmachevo. (In Russ.)
- Рынк, В. В., Кузчуткумов, М. В., Громов, Е. С., & Осинцев, А. М. (2023). Влияние переменного магнитного поля частотой 90 кГц на активность пивных дрожжей. *Холодильная техника и биотехнологии: Сборник тезисов IV национальной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых* (с. 152–156). Кемерово: Кемеровский государственный университет.
- Rynk, V. V., Kuzchutkumov, M. V., Gromov, E. S., & Osintsev, A. M. (2023). Influence of an alternating magnetic field with a frequency of 90 kHz on the activity of brewer's yeast. *Refrigeration Equipment and Biotechnology: Collection of Abstracts of the IV National Conference of Students, Postgraduates, and Young Scientists* (pp. 152–156). Kemerovo: Kemerovo State University. (In Russ.)
- Давидович, Е. А. (2006). Комплексная обработка зернового сырья в спиртовой промышленности. *Пищевая и перерабатывающая промышленность*, (4), 51–63.
- Davidovich, E. A. (2006). Comprehensive processing of grain raw materials in the alcohol industry. *Piševaâ I Pererabatyvaûšaâ Promyšlennost'*, (4), 51–63. (In Russ.)
- Давыденко, С. Г., Устинова, А. С., Меледина, Т. В., & Баркова, Н. В. (2012). Скрининг штаммов спиртовых дрожжей для сбраживания высококонцентрированного сусла. *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия Процессы и аппараты пищевых производств*, 2, 14–18.
- Davydenko, S. G., Ustinova, A. S., Meledina, T. V., & Barkova, N. V. (2012). Screening the alcohol yeast strains for high gravity wort fermentation. *Scientific Journal NRU ITMO. Series Processes and Equipment for Food Production*, 2, 14–18. (In Russ.)
- Гречишникова, А. С. (2015). Влияние применения ультразвуковых технологий на процесс управления выращивания хлебопекарных дрожжей. *Альманах научных работ молодых ученых Университета ИТМО* (с. 119–121). Санкт-Петербург: Издательство Санкт-Петербургский национальный исследовательский

- университет информационных технологий, механики и оптики.
- Grechishnikova, A. S. (2015). The impact of ultrasonic technologies on the management process of bakery yeast cultivation. *Almanac of Scientific Works of Young Scientists of ITMO University* (pp. 119–121). St. Petersburg: Publishing House of St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics, and Optics. (In Russ.)
- Кузнецова, Т. В., Шорманова, М. М., Айтжанова, А. А., Елубаева, М. Е., & Саубенова, М. Г. (2016). Исследование терморезистентности спиртовых дрожжей. *Приволжский научный вестник*, 11(63), 7–10.
- Kuznetsova, T. V., Shormanova, M. M., Aytzhanova, A. A., Yelubaeva, M. E., & Saubenova, M. G. (2016). Study of thermal resistance of alcohol yeast. *Privolzhsky Scientific Journal*, 11(63), 7–10. (In Russ.)
- Кулназаров, Б. А., Кузнецова, Т. В., & Саубенова, М. Г. (2015). Селекция спиртовых дрожжей, обладающих осмофильными свойствами. *Actualscience*, 2(2), 21–22.
- Kulnazarov, B. A., Kuznetsova, T. V., & Saubenova, M. G. (2015). Selection of alcohol yeast with osmo-philic properties. *Actualscience*, 2(2), 21–22. (In Russ.)
- Оверченко, М. Б., Игнатова, Н. И., Серба, Е. М., Римарева, Л. В., & Белокопытова, Е. Н. (2017). Спиртовые расы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с термотолерантными и осмофильными свойствами для интенсификации процесса брожения зернового суслу. *Современные биотехнологические процессы, оборудование и методы контроля в производстве спирта и спиртных напитков: сборник научных трудов* (с. 35–43). Москва: Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи.
- Overchenko, M. B., Ignatova, N. I., Serba, E. M., Rimareva, L. V., & Belokopytova, E. N. (2017). Alcohol yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* with thermotolerant and osmo-philic properties for intensifying the fermentation process of grain wort. *Modern biotechnological processes, equipment, and control methods in the production of alcohol and alcoholic beverages: Collection of scientific papers* (pp. 35–43). Moscow: Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology, and Food Safety. (In Russ.)
- Разиноква, В. Г., Гордеева, А. Б., Борисенко, А. А., & Борисенко, А. А. (2021). Зарубежный опыт и перспективы использования ультразвуковой обработки в пищевой промышленности. *Инновационное развитие аграрно-пищевых технологий: Материалы международной научно-практической конференции* (с. 228–233). Волгоград: СФЕРА.
- Razinkova, V. G., Gordeeva, A. B., Borisenko, A. A., & Borisenko, A. A. (2021). Foreign experience and prospects for the use of ultrasonic treatment in the food industry. *Innovative development of agro-food technologies: Materials of the international scientific and practical conference* (pp. 228–233). Volgograd: SFERA. (In Russ.)
- Римарева, Л. В. (2010). *Теоретические и практические основы биотехнологии дрожжей*. Москва: ДеЛи принт.
- Rimareva, L. V. (2010). *Theoretical and practical foundations of yeast biotechnology*. Moscow: DeLi Print. (In Russ.)
- Сагингалиева, А. Г. (2023). Перспективы развития ультразвуковых технологий для интенсификации процессов. *Инновационное техническое обеспечение агропромышленного комплекса. Материалы научно-технической конференции с международным участием имени А.Ф. Ульянова* (с. 207–214). Саратов: Саратовский государственный университет генетики, биотехнологии и инженерии имени Н.И. Вавилова.
- Sagingaliyeva, A. G. (2023). Prospects for the development of ultrasonic technologies for process intensification. *Innovative technical support for the agro-industrial complex. Materials of the scientific and technical conference with international participation named after A.F. Ulyanov* (pp. 207–214). Saratov: Saratov State University of Genetics, Biotechnology and Engineering Named after N.I. Vavilov. (In Russ.)
- Стецов, Я. Г. (2023). Исследование влияния ультразвуковой обработки на динамику роста биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. *Наука и молодежь: материалы XX Всероссийской научно-технической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых* (с. 292–294). Барнаул: Алтайский государственный технический университет им. И.И. Ползунова.
- Stetsov, Ya. G. (2023). Study of the influence of ultrasonic treatment on the growth dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* yeast biomass. *Science and nouth: Materials of the XX All-Russian Scientific and Technical Conference of Students, Postgraduates, and Young Scientists* (pp. 292–294). Barnaul: Altai State Technical University Named after I.I. Polzunov. (In Russ.)
- Стремин, А. А., & Федоренко, Б. Н. (2023). Использование ультразвука для ускорения экстракции в пищевой промышленности. *Вестник науки*, 5(62), 725–730.
- Stremyn, A. A., & Fedorenko, B. N. (2023). Use of ultrasound to accelerate extraction in the food industry. *Vestnik Nauki*, 5(62), 725–730. (In Russ.)
- Цед, Е. А. (2021). Исследование влияния метаболитических добавок на жизнедеятельность дрожжей в условиях ферментации высококонцентрированного спиртового суслу. *Вестник Могилевского государственного университета продовольствия*, 1(30), 51–62.
- Tsed, E. A. (2021). Study of the effect of metabolic additives on yeast activity under fermentation conditions of high-concentration alcohol wort. *Vestnik Mogilevskogo gosudarstvennogo universiteta prodovol'stviâ*, 1(30), 51–62. (In Russ.)
- Aguilar, K. (2022). Evaluating ultrasound pre-treatment as a tool for improving the process of a fermented beverage made from pineapple by-products. *Food Technology*, 25. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.11621>
- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilku, K. & Versteeg, C. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: A preliminary study on a model system. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9(2), 155–160. <http://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.05.005>

- Bertolo, A. P., Biz, A. P. & Kempka, A. P. (2019) Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): Evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility. *Journal Food Science and Technology*, 56(8), 3697–3706. <http://doi.org/10.1007/s13197-019-03833-3>
- Berzosa, A., Delso, C., Sanz, J., Sánchez-Gimeno, C., & Raso, J. (2023). Sequential extraction of compounds of interest from yeast biomass assisted by pulsed electric fields. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11. <http://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1197710>
- Choudhary, J. C., Surender S., & Nain, L. (2016). Thermotolerant fermenting yeasts for simultaneous saccharification fermentation of lignocellulosic biomass. *Electronic Journal of Biotechnology*, 19(3), 82–92. <http://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.02.007>
- Eom, S. J., Park, J. T., Kang, M. C., Lee, N. H., & Kyung, M. U. (2022). Of ultrasound treatment to extract mannan polysaccharide from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Food Process Engineering*, 5, 9. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14105>
- Ferreira, R. M., Mota, M. J., & Lopes, R. P. (2019). Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high pressure (15, 25 and 35 MPa) to enhance the production of bioethanol. *Food Research International*, 115, 352–359. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.11.027>
- García Martín, J. F., Guillemet, L., Feng, C. & Sun, D. W. (2013). Cell viability and proteins release during ultrasound-assisted yeast lysis of light lees in model wine. *Food Chemistry*, 141(2), 934–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.081>
- González-Centeno, R. (2015). Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. *Ultrasonics Sonochemistry*, 22, 506–514. <http://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.027>
- John, I., Pola, J. & Appusamy, A. (2019). Optimization of ultrasonic assisted saccharification of sweet lime peel for bioethanol production using box–behnen method. *Waste and Biomass Valorization*, 10(2), 441–453. <http://doi.org/10.1007/s12649-017-0072-1>
- Liman Gao, K. X., Hassan, J. U., Zhao, Z., Li, C., Huo, Y. X., & Liu, G. (2018). Improving the thermo-tolerance of yeast base on the antioxidant defense system. *Chemical Engineering Science*, 175, 335–342. <http://doi.org/10.1016/j.ces.2017.10.016>
- Maicas, S. (2020). The role of yeasts in fermentation processes. *Microorganisms*, 8. <http://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>
- Osintsev, A. M., Vasilchenko, I. L., Rodrigues, D. B., Stauffer, P. R., Braginsky, V. I., Rynk, V. V., Gromov, E. S., Prosekov, A. Yu., Kaprin, A. D. & Kostin A. A. (2021). Characterization of ferromagnetic composite implants for tumor bed hyperthermia. *IEEE Transactions on Magnetics*, 57, 1–8. <http://doi.org/10.1109/TMAG.2021.3097915>
- Paulino de Souza, J. (2018). Improvement of Brazilian bioethanol production—Challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated during the ethanol process. *Fungal Biology*, 122(6). <http://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.12.006>
- Permyakova, L., Sergeeva, I., & Dolgolyuk, I. (2023). Combined effect of ultrasound treatment and a mix of krebs cycle acids on the metabolic processes in *saccharomyces cerevisiae*. *Fermentation*, 9(2), 132. <https://doi.org/10.3390>
- Prado, C. D., Mandrujano, G. P. L., & Souza, J. P. (2020). Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation. *Biotechnological Biofuels*, 178. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01817-6>
- Qian, J., Yan, G., Huo, S., Dai, C., Ma, H. & Kan, J. (2021). Effects of pulsed magnetic field on microbial and enzymic inactivation and quality attributes of orange juice. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, 15–33. <http://doi.org/10.1111/jfpp.15533>
- Soro, A. B., Oliveira, M., O'Donnell, C. P., & Tiwari, B. K. (2021). Ultrasound assisted modulation of yeast growth and inactivation kinetics. *Ultrasonics Sonochemistry*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2021.105819>
- Talal, F. Y. (2011). *Mechanical treatment of microorganisms using ultrasound, shock and shear technology* [Unpublished doctoral dissertation]. University of Southern Queensland.
- Walker, G. M., & Walker Roy, S. K. (2018). Chapter three — Enhancing yeast alcoholic fermentations. *Advances in Applied Microbiology*, 10, 87–129. <http://doi.org/10.1016/bs.aambs.2018.05.003>
- Walker, G. M. & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented beverages. *Beverages*, 2(4). <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Wang, S., Thomas, K. C., Ingledew, W. M., Sosulski, K., & Sosulski, F. W. (1997). Rye and triticale as feedstock for fuel ethanol production. *Cereal Chemistry*, 5, 621–625. <http://doi.org/10.1007/BF02920412>